

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-258772

(43)Date of publication of application : 19.11.1991

(51)Int.Cl.

C07D271/12
C09K 11/06
G01N 21/78
G01N 31/22

(21)Application number : 02-056543

(71)Applicant : IMAI KAZUHIRO

(22)Date of filing : 09.03.1990

(72)Inventor : IMAI KAZUHIRO

(54) 4(OR 7)-HYDRAZINO-2,1,3-BENZOXADIAZOLE DERIVATIVE OR SALT THEREOF

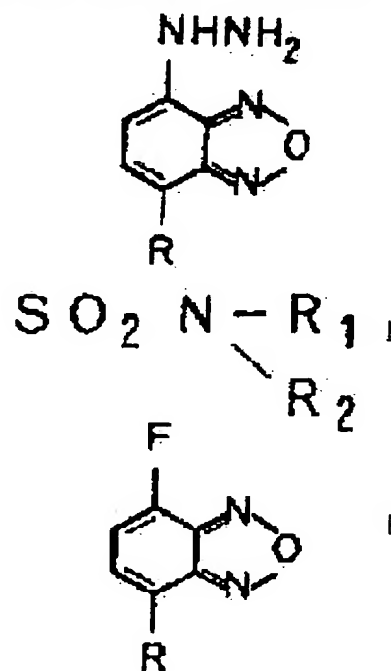
(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A compound expressed by formula I [R is NO₂ or formula II (R₁ and R₂ are H or 1-3C alkyl)] or salts thereof.

EXAMPLE: 4-Hydrazino-7-N,N-dimethylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole.

USE: A fluorescent emitting agent in detecting and determining carbonyl groups and/or carboxyl groups applicable to a wide range of medical researches covering biochemistry, physiology and fundamental and clinical medicines.

PREPARATION: A compound expressed by formula III is reacted with hydrazine in a solvent such as acetonitrile at -10 to +80° C for 1 min to 10 hr to afford the compound expressed by formula I. The resultant compound is applicable to fluorescent quantitative analysis of carbonyl and/or carboxyl compounds in a very small amount of 10⁻¹⁰ to 10⁻⁸M.



⑫ 公開特許公報(A)

平3-258772

⑤ Int. Cl.⁵

C 07 D 271/12
C 09 K 11/06
G 01 N 21/78
31/22

識別記号

1 2 2

庁内整理番号

7624-4C
Z 7043-4H
C 7055-2J
9015-2G

⑬ 公開 平成3年(1991)11月19日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 4 (又は7) - ヒドラジノ - 2, 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール
誘導体またはその塩

⑮ 特 願 平2-56543

⑯ 出 願 平2(1990)3月9日

⑰ 発 明 者 今 井 一 洋 東京都世田谷区代田 6-15-18

⑱ 出 願 人 今 井 一 洋 東京都世田谷区代田 6-15-18

⑲ 代 理 人 弁理士 野崎 鏡也

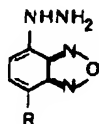
明 細 書

1. 発明の名称

4 (又は7) - ヒドラジノ - 2, 1, 3 - ベン
ゾオキサジアゾール誘導体またはその塩

2. 特許請求の範囲

1. 式 (I)



..... (I)

(式中Rは-NO₂ またはSO₂ N-R₁ (但し
R₂)

R₁, R₂ は水素原子または炭素数1~3のアル
キル基)を表わす)で示される4 (または7) -
ヒドラジノ - 2, 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール誘
導体またはその塩。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、カルボニル基および/またはカルボ

キシル基の検出・定量の際に発蛍光剤として用い
ることのできる4 (または7) - ヒドラジノ -
2, 1, 3 - ベンゾオキサジアゾールの新規誘導体ま
たはその塩に関する。

(従来 の 技 術)

カルボニル基および/またはカルボキシル基を
検出・定量する際の発蛍光試薬としては、従来よ
りダンシルヒドラジン (R. Chayen, R. Dvir,
S. Gould, A. Harel, Anal. Biochem., 42, 283,
(1970)) 及びNBD - ヒドラジン (G. Gubitz,
R. Wintersteiger, R. W. Frei, J. Liq.
Chromatogr., 7, 839(1984).) が知られている。

しかし、このうちダンシルヒドラジンはそれ自
体の蛍光が強く、蛍光生成体との分離を必要とす
るなどの問題点がある。またNBD - ヒドラジン
の方も合成の際に不純物が絶えず付加物として
存在してくるために、純品が得られず実際の
試料の分析に用いることは困難であった (G.
Gubitz, R. Wintersteiger, R. W. Frei, J. Liq.
Chromatogr., 7, 839(1984))。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は上記した従来の発蛍光試薬のような問題点のない新規な発蛍光剤を開発することを課題とするものである。

(課題を解決するための手段)

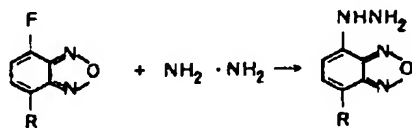
上記課題を解決するため研究を重ねた結果、本発明者は置くべきことに、NBD-ヒドラジンの7位のニトロ基をN,N-ジメチルアミノスルフォニル基、またはアミノスルフォニル基に置換した新規化合物、並びに精製したNBD-ヒドラジンがカルボニルおよび/またはカルボキシル基に対し、著しく高い反応性を有し、従って極微量のカルボニルおよび/またはカルボキシル基が定量できることを見出し、かかる知見から本発明を完成した。

すなわち本発明は下記の構造式(I)



-SO₂NH₂である場合に該当する新規な化合物4-アミノスルフォニル-7-ヒドラジノ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール(ABD-H)が得られる。さらに、4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール(以下NBD-Fと略す)(特許第1473741号)とヒドラジンを反応させることにより、前記式においてRがNO₂である場合に該当する新規な化合物4-ヒドラジノ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール・ヒドラジン塩(NBD-H・NH₂NH₂)が得られる。

(反応式)



上記反応に於いて、使用しうる溶媒としてはテトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、ジオキサン、クロロホルム、ジクロルメタン、ジクロルエタン、ベンゼン、トルエン、酢

で示される4(または7)-ヒドラジノ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾールまたはその塩の新規誘導体である。なお(I)式中Rは-NO₂またはSO₂N(R₁)(R₂)を表わす。

素数1~3のアルキル基)を表わす。

本発明の化合物は文献未載の新規化合物であり、例えば下記の反応式に於いて4-フルオロ-7-N,N-ジメチルアミノスルフォニル-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール(以下DBD-Fと略す)(特開昭60-72874号)、または4-フルオロ-7-アミノスルフォニル-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール(以下ABD-Fと略す)(特開昭60-72874号)とヒドラジンを反応させることにより、前記式においてRが-SO₂NCH₃である場合に該当する新規な化合物7-N,N-ジメチルアミノスルフォニル-4-ヒドラジノ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール(DBD-H)が得られ、または前記式においてRが

酸エチル等の不活性有機溶媒が挙げられる。

上記反応は通常-10℃~80℃の範囲内で行うことができるが、好ましくは0℃~60℃である。

反応に要する時間は、反応温度、反応に供せられる化合物、溶媒等によって異なるが、通常は1分~10時間、好ましくは1分~1時間の範囲で適宜選択される。

反応混合物からの目的物の単離・精製は常法に従って容易に行うことができる。例えば、生じる沈殿の濾取、ジクロルメタン、クロロホルム、酢酸エチル、アセトニトリルのごとき有機溶媒によって抽出、或は活性炭素、シリカゲル、イオン交換樹脂、デキストラン架橋重合体、スチレンもしくはアクリル酸エステル多孔質重合体等を用いた各種のクロマトグラフィーを適用して行うことができる。

出発物質のDBD-F、ABD-F、NBD-Fは既知化合物であり、例えばToyo'oka等の方法(Analyst, 114, 413(1989); Anal. Chem., 56, 2461(1984))及びImai等の方法(Anal. Chim.

Acta, 130, 377(1981))に従って製造することができる。

該ヒドラジンは測定系に影響を与えなければ、DBD-H, ABD-H, NBD-H・NH₂NH₂中のヒドラジノ基とイオンの結合して塩を形成する基をすべて含み、その塩としては硝酸、塩酸、過塩素酸などとの塩を挙げることができる。

本発明化合物のDBD-H, ABD-H, NBD-H・NH₂NH₂は、それ自身では蛍光を示さず、カルボニル基および／またはカルボキシル基と選択的に反応結合したのち顕著な蛍光を示すことから、その蛍光強度を測定すれば検体試料中のカルボニル基および／またはカルボキシル基を検出・定量することができる。

以下に本発明化合物のDBD-H, ABD-H, NBD-H・NH₂NH₂またはその塩それ自体、或いはDBD-H, ABD-H, NBD-H・NH₂NH₂またはその塩を蛍光剤として含有する組成物を用いてカルボニル基および／または

カルボキシル基を定量する際、良好な反応性を期待するための好ましい条件を示す。

まず試料に対し添加するDBD-H, ABD-H, NBD-H・NH₂NH₂の量は、カルボニル基1モルに対し、1モル以上、特に10⁻¹⁰モルが好ましい。次に反応液は無水または含水量の少ないアセトニトリル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドなどが望ましく、特に好ましくは無水である。液性は酸性であり、好ましくはpH0~7である。反応温度は4℃~100℃、好ましくは20℃~50℃である。反応時間は1分~10時間、好ましくは1~300分である。反応中の酸性度を維持するためにはトリフルオロ酢酸、塩酸、過塩素酸を用いることが挙げられる。カルボニル基と結合して得られた蛍光誘導体を励起させ、生じた蛍光強度を測定するための励起波長および蛍光波長として、励起波長は410~490nm、好ましくは450~470nm、蛍光波長は530~600nm、好ましくは548~570nmを選ぶことができる。一方カルボキ

シル基を定量する際、良好な反応性を期待するための好ましい条件は、試料に対し添加するDBD-H, ABD-H, NBD-H・NH₂NH₂の量は、カルボキシル基1モルに対し、1モル以上、特に10~10⁴モルが好ましく、反応液は無水または含水量の少ないアセトニトリル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドが望ましく、特に好ましくは無水である。縮合剤はN,N-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、ジエチルホスフォロシアニデート、ジエチルホスフォルリアチドなどである。反応温度は4℃~100℃、好ましくは10℃~60℃である。反応時間は1分~4時間、好ましくは1~60分である。カルボキシル基と結合して得られた蛍光誘導体を励起させ、生じた蛍光強度を測定するための励起波長および蛍光波長として、励起波長は410~490nm、好ましくは450~470nm、蛍光波長は530~600nm、好ましくは548~570nmを選ぶことができる。

(発明の効果)

本発明化合物のDBD-H, ABD-H, NBD-H・NH₂NH₂は多くの特徴を有するが、列記すると次の如くである。

- (1) カルボニル基および／またはカルボキシル基との反応性が高いために、検出限界を大幅に低下させることができる。
- (2) 盲検値が低いので測定感度が良好である。
- (3) 溶液状態での安定性が高い。有機溶媒中では室温中1週間以上も安定である。
- (4) カルボニル基および／またはカルボキシル基との誘導体の安定性が高い。反応液中の条件下では冷蔵庫中で1週間以上も安定である。

本発明化合物のDBD-H, ABD-H, NBD-H・NH₂NH₂は、前述の特性から10⁻¹⁰ないし10⁻⁸Mの微量のカルボニルおよび／またはカルボキシル化合物の蛍光定量分析に応用できるばかりでなく、ひろく生体組織試料を対象とし顕微鏡の視野内でカルボニル基および／またはカルボキシル基を検出するような組織学的検査、

カルボニル基および／またはカルボキシル基を含有する蛋白質、ペプチドの定量、酸素中のカルボニル基および／またはカルボキシル基の研究、膜、細胞、組織等の生体中のカルボニル基および／またはカルボキシル基の検出とこれら生体構成部分の構造と機能の関係についての検討、種々の分泌液その他の臨床試料中のカルボニル基および／またはカルボキシル基の定量を基礎とした代謝、臨床分析それらの自動化の基礎等、生化学、生理学および基礎、臨床にわたる医学的研究に非常に広範囲の応用が可能である。

(実施例)

次に実施例をあげてさらに具体的に本発明を説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に制約されるものではない。

実施例 1

4-ヒドラジノ-7-N,N-ジメチルアミノスルフォニル-2,1,3-ベンゾオキサジアゾールの合成

4-フルオロ-7-N,N-ジメチルアミノスル

2,1,3-ベンゾオキサジアゾール24gを3mlのアセトニトリルに溶解させたのち、室温にて98%ヒドラジン10μlを加えた。50~55℃で20分間反応させたのち、反応液を減圧濃縮した。残渣をメタノールにて再結晶し、融点184~185℃の橙黄色の針状結晶18gを得た。

元素分析値 $C_6H_7N_5O_3S$ として

	C	H	N	S
理論値 (%)	31.44	3.08	30.55	13.99
実測値 (%)	30.94	2.99	29.89	13.82

EI-MS m/z 229 (M^+)

NMR (DMSO- D_6 , 90MHz) δ (ppm):

6.54(d, CH), 7.83(d, CH)

UV λ アセトニトリル λ_{max} nm (ϵ):

258(4.10×10^3)

IR (KBr) (cm^{-1}): 1640, 1560, 3370

実施例 3

4-ヒドラジノ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール・ヒドラジン塩の合成

4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオ

キシニル-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール80gを12mlのアセトニトリルに溶解させたのち、室温にて98%ヒドラジン40μlを加えた。50~55℃で20分間反応させたのち、反応液を減圧濃縮した。残渣をメタノールにて再結晶し、融点138~139℃の赤褐色の結晶80gを得た。

元素分析値 $C_8H_{11}N_5O_3S$ として

	C	H	N	S
理論値 (%)	37.35	4.31	27.23	12.47
実測値 (%)	37.15	4.23	27.11	12.55

EI-MS m/z 257 (M^+)

NMR (DMSO- D_6 , 90MHz) δ (ppm):

2.87(s, Me), 6.67(d, CH), 7.93(d, CH)

UV λ アセトニトリル λ_{max} nm (ϵ):

246(4.32×10^3)

IR (KBr) (cm^{-1}): 1575, 3330

実施例 2

4-ヒドラジノ-7-アミノスルフォニル-2,1,3-ベンゾオキサジアゾールの合成

4-アミノスルフォニル-7-フルオロ-

キサジアゾール50gを10mlのアセトニトリルに溶解させたのち、室温にて98%ヒドラジン100μlを加えた。50~53℃で20分間反応させたのち、生じる沈殿を濾取した。これをメタノールにて再結晶し、融点300℃以上の黄褐色の結晶45gを得た。

元素分析値 $C_6H_5N_5O_3 \cdot N_2H_4$ として

	C	H	N
理論値 (%)	31.72	3.99	43.16
実測値 (%)	31.66	3.85	42.71

EI-MS m/z 195 (M^+)

NMR (DMSO- D_6 , 90MHz) δ (ppm):

5.79(d, CH), 7.01(d, CH)

UV λ アセトニトリル λ_{max} nm (ϵ):

225(5.24×10^3)

IR (KBr) (cm^{-1}): 1610, 3370

実施例 4

アロピオンアルデヒド(13.9μM)を含む0.1%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル液90μlとABD-HまたはDBD-HまたはNBD-H・NH₂NH₂ 500μMを各々含むアセトニトリル

溶液20 μ lとを混合した3群の検体試料を用意する。これら3群の検体試料を室温で種々の一定時間反応させ、反応終了後、各検体試料20 μ lを採りTSK Gel ODS-80Tmカラムにて、溶離液アセトニトリル-水の容量比35:65または46:54または41:59にて溶出し、日立蛍光光度計F-1000を用いて励起波長450nm、蛍光波長570nmまたは565nmで蛍光強度を測定した。結果を第1図に示す。

実施例 5

次の6種類の物質について、その検出限界を求めた。

- ・プロピオンアルデヒド
- ・n-ブチルアルデヒド
- ・p-ヒドロキシベンツアルデヒド
- ・アセトン
- ・4-ヘプタノン
- ・4'-エチルアセトフェノン

上記物質を各々15~70 μ M含む0.1%トリフルオロ酢酸または1%トリフルオロ酢酸150 μ lを

準備する。これにABD-HまたはDBD-HまたはNBD-H \cdot NH₂NH₂(500 μ M)を含むアセトニトリル溶液150 μ lを加え、この混合液を室温で1時間または5時間反応させる。

反応終了後、各検体試料を日立蛍光光度計50-105を用いて励起波長450nmまたは468nm、蛍光波長550nmまたは535nmで蛍光強度を測定した。なお、検出限界は盲検査の3倍に設定した。さらに上記実験と平行して100 μ Mのアラニンおよびプロリンを用いた対照実験を行った。結果を表1に示す。

(以下余白)

表 1

化 合 物	検出限界 μ M		
	ABD-H	DBD-H	NBD-H \cdot NH ₂ NH ₂
プロピオンアルデヒド	6.7	7.5	6.3
n-ブチルアルデヒド	4.3	5.6	4.4
p-ヒドロキシベンツアルデヒド	84.9	109	>200
アセトン	10.2	9.9	17.9
4-ヘプタノン	18.8	17.1	56.4
4'-エチルアセトフェノン	28.2	31.8	77
アラニン	—	—	—
プロリン	—	—	—

※:検出されなかった

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の化合物の一つであるABD-HおよびDBD-HおよびNBD-H \cdot NH₂NH₂を発蛍光剤として、各々プロピオンアルデヒドと反応させたときの反応時間と生成物のヒドラゾーンの生成率の関係を示すグラフである。図中□-□は発蛍光剤がABD-Hである。以下同様に△-△はDBD-H、○-○はNBD-H \cdot NH₂NH₂である。

特 許 出 願 人 今 井 一 洋

代 理 人 弁 理 士 野 崎 鉄 也

図 1

